

ゲノムインプリンティングドメインの構造・制御・進化

●佐々木 裕之 ◆佐渡 敬

国立遺伝学研究所総合遺伝研究系人類遺伝研究部門

〈研究の目的と進め方〉

ゲノムインプリンティングは、哺乳類の父由来・母由来の対立遺伝子が異なるレベルで発現するよう、親の配偶子形成過程でゲノムにエピジェネティックな印付けを行う現象である。インプリンティングは哺乳類の単為発生が致死に終わる主要な原因であり、様々な先天異常やがんの原因とも関係している。インプリンティングを受ける遺伝子はゲノムの特定の領域にクラスターを形成して存在するが、このクラスター形成はインプリンティングの制御や進化に密接に関わると考えられる。そこで、比較ゲノム学的アプローチにより1つのクラスター（インプリンティングドメイン）の構造をヒトとマウス間で比較し、インプリンティングに関わる制御配列や核内での立体構造に関わる配列の同定と解析を行う。また、インプリンティングがないと考えられているニワトリにおいて相同なクラスターがあるか解析し、このドメインが構造的・機能的にどのように進化してきたのかを探る。

〈研究開始時の研究計画〉

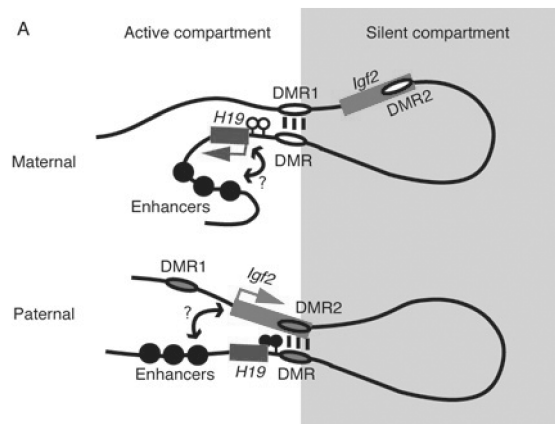
1. マウス第7染色体遠位部にあるインプリンティングドメイン（およそ1 Mbの領域に10個余のインプリンティング遺伝子がある）の全塩基配列を佐賀医大向井ら、理研服部らと共同で決定する。
2. このインプリンティングドメインについて、ヒトとマウスの全塩基配列情報の比較をもとに制御配列を同定し、マウス個体レベルでその機能的な解析を行う。また核内高次構造の足場となる核マトリクス付着部位を同定する。
3. このドメインに対応するニワトリのゲノム領域（およそ0.5 Mb）の配列を決定し、哺乳類との機能的・構造的な比較解析を行う。また、その結果から、インプリンティングドメインの進化について手がかりを得る。

〈研究期間の成果〉

1. マウス第7染色体遠位部にあるインプリンティングドメインの全塩基配列を佐賀医大向井ら、理研服部らと共同で決定した（2、6）。
- 2-1. このインプリンティングドメインのヒトとマウスの配列比較をもとにH19遺伝子下流に種間で保存された配列を複数見つけ、トランスジェニックマウス作成を通してそれらが組織特異的なエンハンサーであることを示した（1）。またIgf2遺伝子とH19遺伝子の間には、DNAメチル化感受性の因子が結合する保存された配列が密に存在する部分があることを見つけた（1）。のちにこの因子はCTCFというインスレーター結合蛋白質であることが判明した。
- 2-2. 英国の研究者との共同研究で、minuteと呼ばれる突然変異を有するマウスでは、我々が発見したH19遺伝子下流のエンハンサーの領域に染色体逆位が生じていることを見つけた（4）。
- 2-3-2-1と同様のヒト-マウス間の配列比較により、Kvlqt1遺伝子のイントロンに高度に保存された制御配列が複

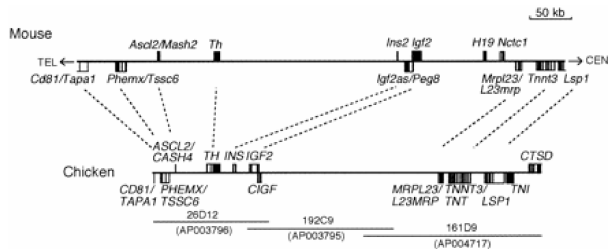
数存在することを見つけた（2）。

- 2-4. CTCFの結合するコンセンサス配列と類似する配列の網羅的検索とヒト-マウス間の配列比較により、H19遺伝子下流に保存されたCTCF結合配列を見つけた（5）。この配列はトランスフェクションした細胞内で実際にインスレーター活性をもっており、インプリンティングドメインと非インプリンティングドメインの境界として働く可能性が推測された（5）。
- 2-5. このマウスのインプリンティングドメイン内にあるTh遺伝子とIns2遺伝子の間には、210-kbに及ぶ反復配列の集積が存在することが分かった（6）。この領域の30%はタンDEM型反復配列、46%はLINE-1やIAPなどのレトロトランスポゾンで占められており、父由来・母由来の染色体間で非同調的に複製していた（6）。レトロトランスポゾンはメチル化などによりサイレンシングされる主要な標的であることから、この210-kbの領域がインプリンティング制御に積極的に関わる可能性と、その存在位置から考えて、このインプリンティングドメインを2つのサブドメインに分割する境界として働く可能性の2つが考えられた。
- 2-6. このインプリンティングドメイン全体をカバーするコスミドコンティグをプローブとして用い、*in vitro*の実験により合計53箇所の核マトリクス結合領域（matrix attachment region, MAR）を同定した（7）。また、上記の210-kbの反復配列の集積領域には19箇所のMARが存在することが分かった。MARは染色体上で境界配列として働きうることから、この結果は集積領域がサブドメインの境界であるという説を支持するものと考えられた。
- 2-7. 英国のReikらの発表した研究内容に我々の成果を加味し、Igf2、H19両遺伝子のインプリンティングとクロマチンのループ形成との関係を議論した（9）。



- 3-1. このドメインに対応するニワトリのゲノム領域（第5染色体上にある、およそ0.5 Mb）の全塩基配列を決定し、H19遺伝子以外の遺伝子は全て保存され、クラスターを形成していることを見つけた（8）。しかし、哺乳類でインプリンティングに関わることが分かっている制御配列は検出できなかった。

3-2.対立遺伝子特異的な発現解析の結果、哺乳類でインプリンティングを受ける遺伝子のオルソログであるIGF2 (3)、ASCL2/CASH4 (8)、INS (8) はインプリンティングを受けないことを示した。また、別の染色体上にあるインプリンティング遺伝子MPR/IGF2RのニワトリオルソログMPR1もインプリンティングを受けないことが分かった (3)。



3-3.以上より、このドメインの遺伝子はインプリンティングが出現する以前からクラスターを形成していたこと、ほとんどのインプリンティング制御配列は進化上鳥類と哺乳類が分岐した後に出現したことが分かった (8)。

〈国内外での成果の位置づけ〉

このマウスのインプリンティングドメインの解析はFeinbergやWalterらも報告したが、それぞれ非常に不完全なものや部分的なものであり、210-kbの反復配列の集積の同定やMARのマッピングなどを含めて完全な解析を行ったのは我々が初めてである。我々がヒト-マウス間の配列比較によりエンハンサーなどを同定した論文 (1) はすでに42回引用されており (2006年1月現在)、また、H19遺伝子下流に見つけたインスレーターの候補 (5) は海外の研究者からSasaki elementと呼ばれるなど、本研究は高く評価されている。

ニワトリのIGF2やMPR1がインプリンティングを受けないことはTilghmanやJirtleらも報告しているが、それ以外の遺伝子については我々だけの報告である。マウスとニワトリのインプリンティングドメイン比較解析 (8) も高く評価され、第17回国際マウスゲノムカンファレンス (2003年) においてGenome Research Poster賞を授与されている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

詳細な解析を行ってデータをまとめるのに予想以上に時間を要したが、当初の計画は全て達成することができた。

〈今後の課題〉

マウスで同定したH19遺伝子下流のインスレーターの候補やサブドメイン間の反復配列の集積領域 (MARの集積領域でもある) の働きを個体レベルで調べるためには、ノックアウトマウスを作成し、解析することが必要である。インプリンティングの乱れや周囲の遺伝子の発現異常が見られると面白い。表現型を期待できるかどうか不明だが、反復配列がjunk DNAでないことを示せる可能性もある。また、例えば表現型が観察されなくとも、エピゲノム解析などにおいて反復配列をどう取り扱うかという問題に対して、有用な知見が得られるであろう。

また、鳥類にはインプリンティングが無いことをほぼ確立できたため、今後インプリンティングの進化を理解するためには単孔類や有袋類の解析が必要となってくる。実際そのような研究が国内外で始まっており、JirtleらはすでにIGF2とMPRのインプリンティングは有袋類にはあるが単

孔類にはないと報告している。今後の展開が興味深い。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 0111151219
Ishihara, K., Hatano, N., Furuumi, H., Kato, R., Iwaki, T., Miura, K., Jinno, Y. & Sasaki, H. Comparative genomic sequencing identifies novel tissue-specific enhancers and sequence elements for methylation-sensitive factors implicated in Igf2/H19 imprinting. *Genome Res.* 10, 664-671 (2000).
- 0202181940
Yatsuki, H., Watanabe, H., Hattori, M., Joh, K., Soejima, H., Komoda, H., Xin, Z., Zhu, X., Higashimoto, K., Nishimura, M., Kuratomi, S., Sasaki, H., Sakaki, Y. & Mukai, T. Sequence-based structural features between Kvlqt1 and Tapa1 in mouse chromosome 7F4/F5 corresponding to the Beckwith-Wiedemann syndrome region in human 11p15.5: long-stretches of unusually well conserved intronic sequence of Kvlqt1 between mouse and human. *DNA Res.* 7, 195-206 (2000).
- 0111151225
Yokomine, T., Kuroiwa, A., Tanaka, K., Tsudzuki, M., Matsuda, Y. & Sasaki, H. Sequence polymorphisms, allelic expression status and chromosomal locations of the chicken IGF2 and MPR1 genes. *Cytogenet. Cell Genet.* 93, 109-113 (2001).
- Davies, K., Bowden, L., Smith, P., Dean, W., Hill, D., Furuumi, H., Sasaki, H., Cattanch, B. & Reik, W. Disruption of mesodermal enhancers for Igf2 in the minute mutant. *Development* 129, 1657-1666 (2002).
- Ishihara, K. & Sasaki, H. An evolutionarily conserved putative insulator element near the 3' boundary of the imprinted Igf2/H19 domain. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1627-1636 (2002).
- Shirohzu, H., Yokomine, T., Sato, C., Kato, R., Toyoda, A., Purbowasito, W., Suda, C., Mukai, T., Hattori, M., Okumura, K., Sakaki, Y. & Sasaki, H. A 210-kb segment of tandem repeats and retroelements located between imprinted subdomains of mouse distal chromosome 7. *DNA Res.* 11, 325-334 (2004).
- Purbowasito, W., Suda, C., Yokomine, T., Zubair, M., Sado, T., Tsutsui, K. & Sasaki, H. Large-scale identification and mapping of nuclear matrix-attachment regions in the distal imprinted domain of mouse chromosome 7. *DNA Res.* 11, 391-407 (2004).
- Yokomine, T., Shirohzu, H., Purbowasito, W., Toyoda, A., Iwama, H., Ikee, K., Hori, T., Mizuno, S., Tsudzuki, M., Matsuda, Y., Hattori, M., Sakaki, Y. & Sasaki, H. Structural and functional analysis of a 0.5-Mb chicken region orthologous to the imprinted mammalian Ascl2/Mash2-Igf2-H19 region. *Genome Res.* 15, 154-165 (2005).
- Kato, Y. and Sasaki, H. Imprinting and looping: epigenetic marks control interactions between regulatory elements. *BioEssays* 27, 1-4 (2005).